

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

KVANTITATIVNE I MOLEKULARNE METODE ZA ANALIZU FITOPLANKTONA

QUANTITATIVE AND MOLECULAR METHODS FOR PHYTOPLANKTON ANALYSIS

SEMINARSKI RAD

okolišu
sciences)
Moraj

Nives Novosel
Preddiplomski studij znanosti o
(Undergraduate Study of Environmental
Mentor: prof.dr.sc. Anđelka Plenković-

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. KVANTITATIVNE METODE ANALIZE FITOPLANKTONA.....	3
2.1. UTERMÖHL METODA.....	4
2.2. METODE KOMORA ZA BROJANJE FITOPLANKTONA.....	5
2.3. FILTRIRANJE I BOJANJE UZORKA KALKOFLUOROM -KVANTITATIVNA EPIFLUORESCENCIJSKA MIKROSKOPIJA.....	6
2.4. SNIMANJE PROTOČNOM CITOMETRIJOM – “FlowCAM“ metoda.....	7
3. MOLEKULARNE METODE ANALIZE FITOPLANKTONA.....	8
3.1. DETEKCIJA FITOPLANKTONSKIH STANICA TESTOVIMA HIBRIDIZACIJE.....	9
3.2. ELEKTROKEMIJSKA DETEKCIJA FITOPLANKTONA BIOSEZNOROM.....	10
3.3. DETEKCIJA FITOPLANKTONA MIKROČIPOVIMA.....	11
3.4. PCR ZA DETEKCIJU I BROJANJE STANICA FITOPLANKTONA.....	12
4. LITERATURA.....	14
5. SAŽETAK.....	16
6. SUMMARY.....	16

1. UVOD

Fitoplankton(biljni plankton) čine jednostanični i kolonijalni mikroorganizmi iz carstva Protista. On je kao skup fotosintetskih autotrofnih organizama osnova hranidbenog lanca u svim vodenim ekosustavima, te je i kritična komponenta vodenih ekosustava jer je odgovoran za otprilike polovicu globalne neto primarne proizvodnje. Također, fitoplankton modifikacijama u broju i raznolikosti svojih zajednica, služi kao pokazatelj hidro-klimatskih promjena koje su posljedica globalnog zatopljenja, te ostalih utjecaja na okoliš, kao što je zakiseljavanje oceana zbog izgaranja fosilnih goriva i eutrofikacije (Karlson i sur., 2010.).

U određenim uvjetima okoliša fitoplankton može doživjeti povišenje stope rasta i postizanje visoke gustoće stanica, te se ta pojava naziva se cvjetanje mora. Uzroci cvjetanja mogu biti različiti. Neka su prirodni događaji, poput proljetnog cvata dijatomeja. Tada na umjerenim geografskim širinama postoji eksplozija rasta dijatomeja tijekom proljeća, kao odgovor na sve veću količinu svjetlosti, povišenje temperature i stabilizaciju stupca vode, te je ono dio prirodnog, godišnjeg ciklusa fitoplanktona. S druge strane, cvjetanja mogu imati negativan utjecaj na vodene sustave te se nazivaju toksičnim cvjetanjem. Vrste koje uzrokuju takva štetna, toksična cvjetanja poput dinoflagelata *Karenia mikimotoi*, formiraju cvatove velike gustoće, uzrokujući promjene boje vode te anoksiju kao posljedicu ugibanja kolonija. Upravo zbog anoksije vode dolazi do ugibanja bentoskih organizama, poput školjaka, puževa, zvjezdača i riba, što obično ima velik utjecaj na akvakulturu određenog područja. Iz tog razloga, mnoge regije svijeta provode programe monitoringa fitoplanktona kako bi zaštitili svoju industriju akvakulture i turističku djelatnost. Takvi programi daju saznanja o razmjerima otrovnih cvjetanja i dinamici toksičnog fitoplanktona određenog područja. Ključni elementi u navedenim programima su upravo brojanje, odnosno kvantifikacija te identifikacija štetnih vrsta fitoplanktona (Karlson i sur., 2010.).

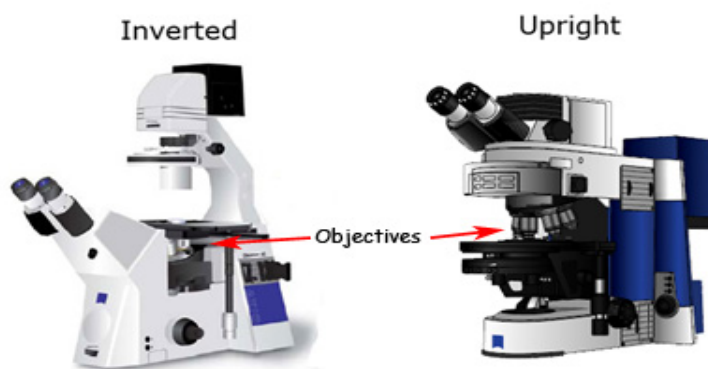
Precizno i točno prepoznavanje i kvantificiranje fitoplanktonskih organizama u uzorcima s terena je od velike važnosti za održavanje vremenske serije podataka o rasprostranjenosti i brojnosti svojti u biološkim oceanografskim istraživanjima, kao i u navedenim programima nadzora planktona.

Danas su za postupke kvantifikacije i identifikacije fitoplanktona dostupne brojne i raznolike klasične metode temeljene na mikroskopskim promatranjima morfoloških obilježja stanica, kao i molekularne metode temeljene na genetičkoj raznolikosti fitoplanktonskih organizama, a odabir metode ovisi o prirodi samog istraživanja te o raspoloživim resursima (Karlson i sur.,2010.).

2. KVANTITATIVNE METODE ANALIZE FITOPLANKTONA

Kvantitativne metode analize fitoplanktona odnose se prvenstveno na određivanje broja, ali i raznolikosti organizama u uzorcima prikupljenim iz različitih vodenih sustava.

Izumom mikroskopa u 17. stoljeću omogućena su detaljna promatranja i analize fitoplanktona, te se može reći da je razvoj klasičnih metoda za analizu fitoplanktona tekao usporedno s razvojem mikroskopa. Visokokvalitetan mikroskop bitan je pri brojanju i identifikaciji fitoplanktonskih vrsta. Upotrebljavaju se dvije vrste mikroskopa: (1) standardni (uspravni) mikroskop i (2) invertni (obrnuti) mikroskop. Kod invertnog mikroskopa objektiv je postavljen ispod stolića s uzorkom, što je neophodno pri analizi uzoraka u raznim sedimentacijskim komorama u kojih se fitoplanktonske stanice talože na dnu (Karlson i sur., 2010.) .



Slika 1. Usporedba invertnog i standardnog (uspravnog) mikroskopa

(Preuzeto s: <http://microscopy.duke.edu/learn/introtomicroscopy/configurations.html>)

Okulari mikroskopa koji se koriste pri analizama fitoplanktona opremljeni su matematičkim mrežama koje omogućavaju mjerenje dimenzija stanica pri različitim povećanjima.

Većina fitoplanktonskih vrsta prozirna je pod svjetlom mikroskopa pa se koriste razne metode bojanja stanica (Karlson i sur., 2010.). Najčešće se koriste fluorescentne boje, odnosno fluorokromi koji fluoresciraju ako su obasjani ultraljubičastim zrakama, a za promatranje uzoraka obojenih navedenim bojama koristimo posebni fluorescentni mikroskop ili običan mikroskop uz dodatak prikladnih leća. (<http://www.medicinski-leksikon.info/znacenje/fluorokrom.html>) .

Fluorescencija generirana iz fotosintetskih pigmenata u fitoplanktona važno je svojstvo koje se može koristiti pri identifikaciji i određivanju broja vrsta. Navedenu pojavu najbolje je promatrati kod živih uzoraka, te onih konzerviranih sa formaldehidom, pri čemu je važno napomenuti da ako se lugolova otopina koristi kao konzervans, prirodna fluorescencija nije vidljiva.

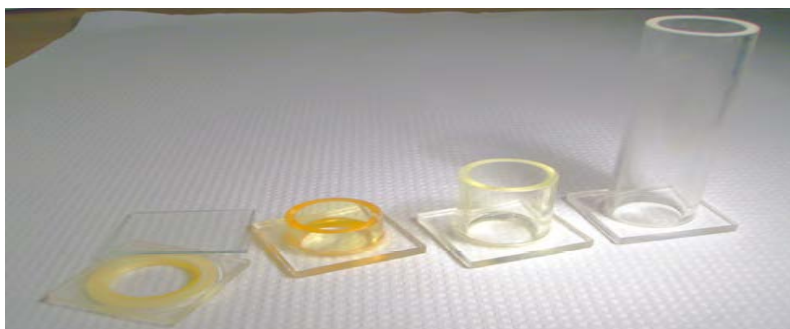
Sve u svemu, klasična analiza fitoplanktona mikroskopom može biti dugotrajna, a osobe koje provode analizu moraju imati iskustvo, te potrebne vještine kako bi numerirali te identificirali stanice planktona pomoću morfoloških značajki. Upravo zbog toga, znanstvenici sve više rade na razvoju automatiziranih metoda za prebrojavanje i prepoznavanje fitoplanktonskih vrsta na temelju poznatih uzoraka iz prethodno generirane baze (Karlson i sur., 2010.).

2.1. UTERMÖHL METODA

Utermöhl metoda je osnovna i najraširenija metoda za klasičnu kvantitativnu analizu fitoplanktona kojom se određuje količina i raznolikost bilnog planktona u uzorcima vode, a moguće je i odrediti oblik i veličinu individualnih stanica.

Metoda se temelji na gravitacijskom taloženju fitoplanktonskih stanica iz uzoraka vode na dnu sedimentacijske komore koja se sastoji od cilindra te osnovne ploče, napravljene od tankog stakla, jer debljina stakla utječe na rezoluciju koju je moguće postići mikroskopom. Nakon taloženja stanica na dnu komore slijedi determinacija i prebrojavanje pomoću invertnog mikroskopa.

Kvantitativna analiza započinje pregledom cijelog dna komore na malom povećanju, kako bi se dobio uvid o gustoći i distribuciji stanica. Brojanje se izvodi na malom povećanju, dok se analiza i determinacija izvode što većem povećanju. U svrhu izjednačene usporedbe između različitih uzoraka, područja i vremena uzorkovanja, važno je uvijek analizirati iste vrste na istom povećanju. Razvojem mikroskopskih tehnika, te značajki sedimentacijskih komora Utermöhl metoda (Utermöhl, 1931.) omogućava vrlo preciznu analizu fitoplanktona. No, s druge strane, za preciznu analizu jednog uzorka navedenom metodom treba utrošiti puno vremena, te time i resursa, a analizu ne može izvoditi bilo tko, već iskusni analitičar dobro upoznat s morfologijom i taksonomijom fitoplanktona (Edler i Elbrächter, 2010.).



Slika 2. Sedimentacijske komore različitih volumena

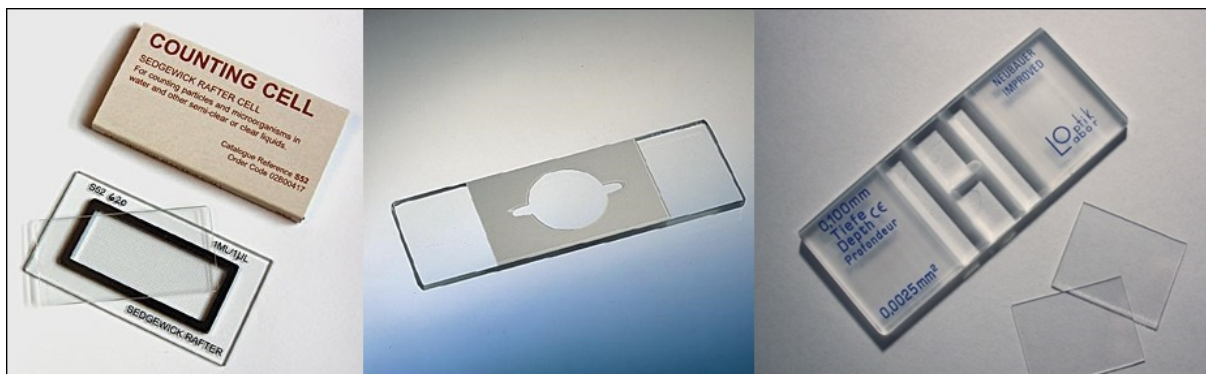
(Preuzeto iz: Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis, 2010.)

2.2 METODE KOMORA ZA BROJANJE FITOPLANKTONA

Tri vrste komora za brojanje koje se najčešće upotrebljavaju u laboratorijima za analizu fitoplanktona su hemocitometrijska, Palmer-Maloney i Sedgewick-Rafter komora. Metode kvantitativne analize fitoplanktona komorama za brojanje su jednostavne za uporabu, a zahtijevaju konzerviran uzorak, kvalitetan mikroskop, te predmetno stakalce s komorom specifičnog oblika u koju se ulijeva određeni volumen uzorka. Troškovi navedenih metoda su niski, a vrijeme potrebno za njihovu izvedbu je kratko, jer se za razliku od Utermöhl metode radi s manjim volumenima ukupnog uzorka, pa je i vrijeme taloženja stanica na dnu komorica znatno kraće. Upravo zato, dobro je imati na izbor sve tri metode u laboratoriju. Nadalje, ove metode su posebno prikladne za uzorke koji sadrže visoku koncentraciju stanica istih vrsta, kao što je to pri cvjetanju fitoplanktona (LeGresley i McDermott, 2010.).

Postupak izvođenja analiza isti je za sve tri vrste komorica. Prvo se odmjeri određeni volumen prethodno konzerviranog i homogeniziranog uzorka te se ulije u komore na predmetnom stakalcu, koje se zatim pokriva pokrovnim staklom kako uzorak ne bi ispario. Navedeno stakalce zatim se stavlja na mikroskop pomoću kojeg se, pod odgovarajućim povećanjem, broje stanice fitoplanktona.

Sedgewick-Rafter komora se zbog velikog zapremnog volumena (1 mL) za razliku od ostalih komora, koristi za analizu uzoraka vode koji sadrži veće vrste fitoplanktona, uglavnom mikrop planktonske vrste. Palmer-Maloney komora za brojanje je okrugla i može sadržavati 0,1 mL uzorka, te se koristi za kvantitativnu analizu nanoplanktona, dok se hemocitometrijska predmetnica za brojanje koristi za kvantitativne analize ekstremno visokih koncentracije stanica malih organizama, odnosno pikoplanktona. Sastoji se od dvije međusobno odvojene komorice za uzorak, a preko obje se stavlja pokrovno staklo (LeGresley i McDermott, 2010.).



Slika 3. Sedgewick-Rafter, Palmer- Maloney i hemocitometrijska komora za brojanje

(Preuzeto i prilagođeno s : http://www.thomassci.com/Equipment/Counters/_/THOMAS-NANOPLANKTON-COUNTING-SLIDE; <http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>; https://www.tedpella.com/calibration_html/Light-Microscopy-Calibration-Standards.html)

2.3. FILTRIRANJE I BOJANJE UZORKA KALKOFLUOROM – KVANTITATIVNA EPIFLUORESCENCIJSKA MIKROSKOPIJA

Dinoflagelati rodova *Dinophysis*, *Prorocentrum*, *Alexandrium*, *Pyrodinium* te *Ostreopsis* i *Gambierdiscus* tvore toksična cvjetanja, te mogu izazvati probleme u akvakulturi i ribarstvu, čak i kada se pojavljuju u niskim koncentracijama. Upravo zato, bitno je provoditi programe praćenja prisutnosti i brojnosti navedenih rodova, posebice u regijama u kojima je razvijena obalna industrija, a to se vrši kvantitativnom epifluorescencijskom metodom.

Kvantitativna epifluorescencijska metoda uključuje filtraciju i bojanje organizama na polikarbonatnim filtrima. Metoda je bazirana na uporabi kalkofluora, fluorescencijske boje koja, ako je obasjana ultraljubičastim svjetlom fluorescira. Zato se uzorci nakon filtracije i bojenja, analiziraju pod epifluorescencijskim mikroskopom, točno određene valne duljine UV uzbude i filtra emisije. Kalkofluor je specifično bojilo koje se veže za celulozu u pločama tekatnih dinoflagelata, a njegova posebnost za analize dinoflagelata leži u tome što ne boja strukture ostalih pelagičkih organizama, kao što su dijatomeje. Dijatomeje su također fluorescencijski organizmi koji čine veliki dio biomase obalnih voda, te zbog tog otežavaju analizu dinoflagelata. No, opisana metoda omogućuje pouzdanu procjenu broja toksičnih tekatnih dinoflagelata, čak i u prisutnosti velikih koncentracija dijatomeja (Andersen, 2010.).



Slika 4. *Dinophysis* sp. obojan kalkofluor bojom promatran epifluorescencijskim mikroskopom
(IZVOR: Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis, 2010.)

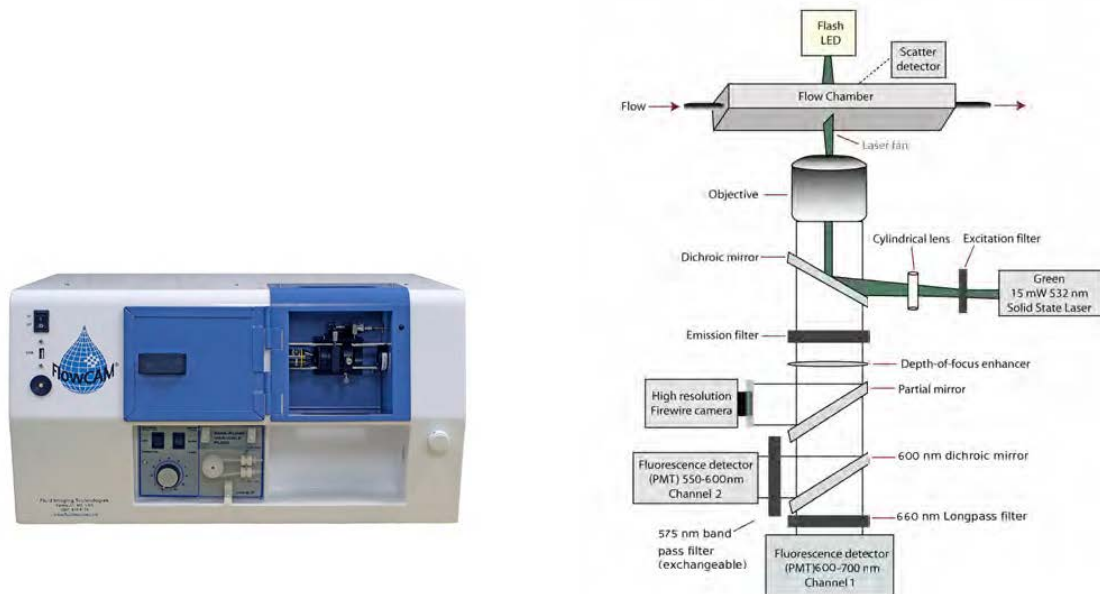
2.4. SNIMANJE PROTOČNOM CITOMETRIJOM – “FlowCAM“ metoda

Pri analizama kakvoće vode veliku prednost imaju metode koje omogućavaju automatizirano brojanje, snimanje te spremanje slika čestica ili organizama u uzorku. Tradicionalne, mikroskopske metode brojanja čestica mogu biti zamorne i dugotrajne. “FlowCAM“ metoda snimanja protočnom citometrijom, stvara digitalne slike čestica u struji fluida, koje su detektirane pomoću laserske svjetlosti. Navedena metoda omogućava mjerenje mnogih parametara stanica kao što su dužina, širina, kružni promjer te stupanj fluorescencije. Također, “FlowCAM“ uređaj detektira i mjeri emisiju fluorescencije na dvije različite razine valnih duljina, obično crvenu i narančastu fluorescenciju koje ukazuju na prisutnost klorofila ili fikoeritrina unutar pojedinačnih stanica u uzorku (Poulton i Martin, 2010.).

Uređaj se sastoji od staklene tube kroz koju protječe uzorak na koju je okomito postavljena kamera sa sustavom leća i lasera. Svaka stanica digitalno se snima i arhivira uz pomoć “FlowCAM“ softvera pa je analizu uzorka moguće učiniti odmah nakon završetka snimanja uzorka ili u nekom drugom trenutku. Nadalje, softver omogućuje korisniku stvaranje baze podataka koje mu pomažu pri identifikaciji i usporedbi organizama, a korisnik ima mogućnost organizirati, filtrirati i sortirati različite uzorke s različitih terena u definirane kategorije.

“FlowCAM“ uređaj je izvorno razvijen za otkrivanje i kvantifikaciju fitoplanktona, te je idealan za analizu prirodnih uzoraka koji sadrže određene skupine ili vrste mikroplanktona koje se obično broje korištenjem tradicionalnih mikroskopskih tehnika.

Količina rada potrebnog za obradu i rukovanje uzorcima znatno je smanjena korištenjem “FlowCAM“ uređaja za analizu mikrofitoplanktona, a samim time smanjeni su i vrijeme i troškovi analize (Poulton i Martin, 2010.) .



Slika 5. “FlowCAM“ uređaj-vanjski izgled i shema principa rada

(Preuzeto i prilagođeno iz: Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis, 2010.)

3. MOLEKULARNE METODE ANALIZE FITOPLANKTONA

Zbog ograničenja klasičnih morfoloških metoda pri identifikaciji fitoplanktona, studije mikroalgi sve više zahtijevaju uporabu molekularnih metoda. Većina molekularnih tehnika ima svoje podrijetlo u medicinskoj znanosti, a tijekom posljednja tri desetljeća te su tehnike izmijenjene i prilagođene za uporabu u identifikaciji i kvantifikaciji algi.

Molekularne metode za cilj imaju udaljiti se od identifikacije i klasifikacije vrsta pomoću morfoloških karakteristika, već one proučavaju razlike između vrsta na razini gena. Danas se opis novih vrsta, otkrivanje i stvaranje novih rodova te premještanje jedne vrste u drugi, novi rod, temelji upravo na podacima dobivenim molekularnim analizama genoma. Drugim riječima, prostorno odvojene populacije istih vrsta mogu pokazivati različita svojstva, kao što je proizvodnja toksina, te proučavajući razlike unutar genoma, možemo zaključiti da su to iste vrste, samo različitih svojstva zbog različitih karakteristika staništa. Također, razvitak molekularnih metoda omogućio je i poboljšao razumijevanje evolucijskih odnosa između svojti biljnog planktona (Karlson i sur., 2010.) .

Molekularne metode temelje se na molekulama ribosomske RNA (rRNA) i DNA koje su meta za oligonukleotidne probe, odnosno kratke sintetske DNA ili RNA molekule komplementarne ciljnim DNA i RNA molekulama. Naime, ribosomi su mjesta odgovorna za sintezu proteina u svim stanicama. Stanice sadrže mnogo ribosoma, jer je sinteza proteina

neizostavan i stalan stanični proces. Svaki ribosom se sastoji od ribosomalnih RNA molekula (rRNA) i proteina. RNA unutar ribosoma formira oblik koji omogućava sintezu proteina i upravo to savijanje molekule ključno je za održavanje pravilne funkcije ribosoma. U unutrašnjost presavijene RNA nalaze se područja konzerviranih sekvenci koje se ne smiju promijeniti, jer se u protivnom molekula neće presaviti ispravno. Više varijabilne regije molekule RNA nalaze se na površini molekule te tako ne ometaju presavijanja molekule.

Prema tome, na temelju konzerviranih i varijabilnih regija rRNA, može se izraditi popis baznih sekvenci različitih taksonomskih skupina. A upravo se te kratke sekvence koriste za razvoj proba za identifikaciju organizama na različitim taksonomskim razinama. S obzirom na ogromnu količinu brzo gomilajućih podataka sekvenci tj. proba za sve vrste organizama, sve je više organizama moguće detektirati (Töbe i sur., 2010.).

3.1. DETEKCIJA FITOPLANKTONSKIH STANICA TESTOVIMA HIBRIDIZACIJE

- Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)

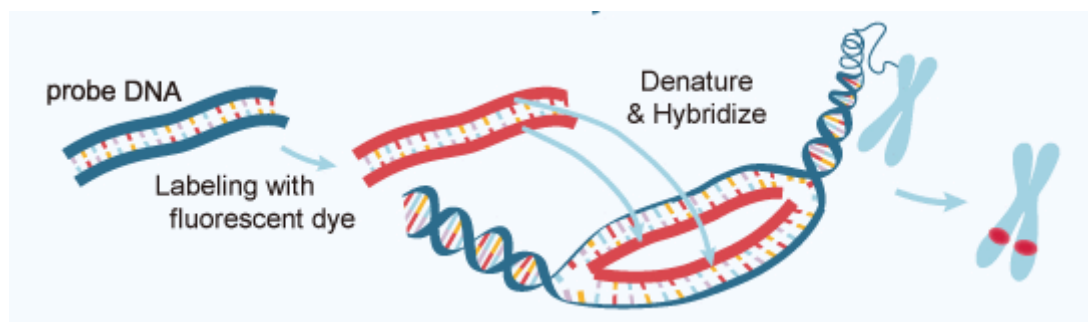
Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) temelji se na činjenici da stanice alga hibridiziraju s fluorescentno obilježenim oligonukleotidnim probama, koje se vežu na komplementarne ciljne sekvence RNA ribosoma, što rezultira jarkim obilježavanjem cijele stanice (Töbe i sur., 2010.). Hibridizacija se odnosi na spajanje dvaju jednostrukih lanaca nukleinskih kiselina koje sadrže komplementarne sekvence. Ona koristi osnovno strukturalno svojstvo DNA, odnosno strukturu dvostruke uzvojnice u kojoj su dva lanca povezana s vodikovim vezama. Kad se DNA zagrijava na temperaturi iznad 90° C, vodikove veze pucaju, a DNA je podijeljena u dva odvojena komplementarnih lanaca. U suprotnome, pri nižim temperaturama, dva jednostruka lanca ponovo se povezuju. Iz navedenog slijedi da će se komplementarne nukleinske kiseline s visokim stupnjem komplementarnosti vezati zajedno čvršće i lakše (Gescher, Metfies i Medlin, 2010) .

Naime, stanice fitoplanktona prvo se fiksiraju s konzervansom koji zapravo čini stanične membrane propusnijima za ulazak probe u stanicu. Fluorescentno označena proba zatim dospijeva na ribosome i veže se na regiju rRNA kojoj je komplementarna. Nakon toga, uzorak se pregledava pod fluorescentnim mikroskopom, uz svjetlo točno određene valne duljine, zbog kojeg se fluorescentne boje pobuđuju, te se stanice od interesa se mogu lako uočiti.

FISH metoda za otkrivanje RNA i DNA algi je vrlo osjetljiva, broj stanica koje se mogu detektirati ovisi o volumenu uzorka, a važno je imati na umu da visoka biomasa uzorka može zasjeniti pogled na ciljne stanice. Postoji više različitih vrsta FISH metoda koje se

upotrebljavaju u detekciji stanica algi, sve funkcioniraju po istom opisanom osnovnom principu, s određenim razlikama u protoklu ovisno o vrsti uzorka koji se analizira.

Također, nisu sve probe komplementarne svim vrstama, već će hibridizirati s nukleinskim kiselinama samo morfološki identičnih organizama zbog njihove genetičke komplementarnosti. Sve u svemu, ako se proba pokaže komplementarna ciljnom organizmu, a oprema potrebna za identifikaciju hibridizacije i naknadne mikroskopske analize stoji na raspolaganju, navedena tehnika može biti korisna i jednostavna za uporabu (Töbe i sur., 2010.).



Slika 6. Shematski prikaz FISH tehnike

(Preuzeto i prilagođeno s: <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7BB4285500-DB85-435D-BE02-2BF420D5C70D%7D>)

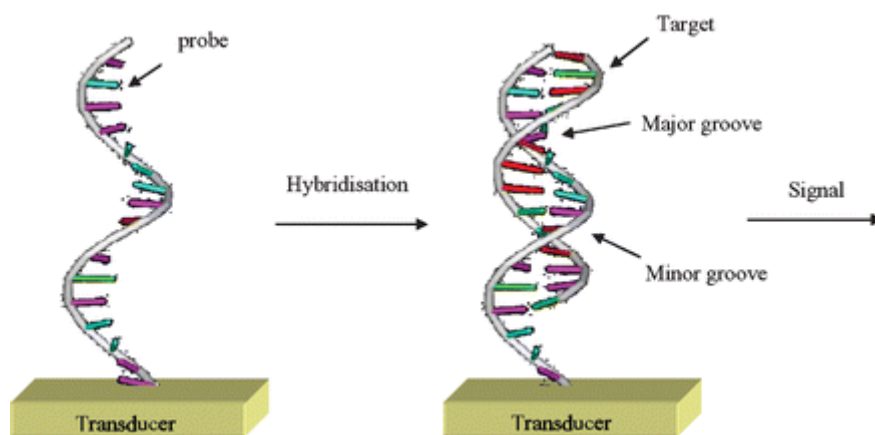
3.2. ELEKTROKEMIJSKA DETEKCIJA FITOPLANKTONA BIOSEZNOROM

DNA-biosenzori su uređaji koji koriste molekularne probe za detekciju ciljanih nukleinskih kiselina u uzorku, a upotrebljavaju se u velikom broju različitih znanstvenih područja. Elektrokemijski biosenzori kombiniraju biokemijsko prepoznavanje s transdukcijom signala za detekciju specifičnih molekula. Biosenzor se sastoji od pretvarača (“transducer”) koji pretvara nastalu fizičku ili kemijsku promjenu u mjerljivi signal, te prepoznavajućeg agensa koji omogućava detekciju samo one vrste koja nam je od interesa. Komponente detekcije ili prepoznavajući agensi su antitijela, enzimi ili druge biomolekule, koje kataliziraju reakciju ili se specifično veže na molekulu od interesa. Različite vrste biosenzora mogu koristiti različite načine detekcije kao što su optičko, bioluminiscentno, toplinsko, maseno i elektrokemijsko prepoznavanje (Diercks, Metfies i Medlin, 2010) .

Identifikacija toksičnih algi biosenzorom temelji se na oligonukleotidnim probama koje ciljaju specifična mjesta ribosomalnih RNA. Ciljevi za probe su male i velike podjedinice rRNA gena u ribosomima stanica. Konzervirane i varijabilne regije u ovim genima omogućuju razvoj proba specifičnih za različite taksonomske razine, a specifičnost

probe ovisi o broju sekvenci ciljnog gena dostupnih u bazi podataka. Drugim riječima, ako je molekularna proba dizajnirana od samo nekoliko sljedova, postoji opasnost od hibridizacije na ne ciljanu vrstu i na druge vrste čije sekvence nisu u bazama podataka.

Postupak elektrokemijske detekcije uz pomoć mobilnih biosenzora je brz postupak za otkrivanje ciljanih vrsta algi u uzorku vode. Elektrode se mogu masovno i povoljno proizvoditi, a protokoli te uputstva za rukovanje uređajem su jednostavni za čitanje i korištenje (Diercks, Metfies i Medlin, 2010.) .



Slika 7. Princip rada biosenzora

(Preuzeto s: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2007/an/b701816a#!divAbstract>)

3.3 DETEKCIJA FITOPLANKTONA MIKROČIPOVIMA

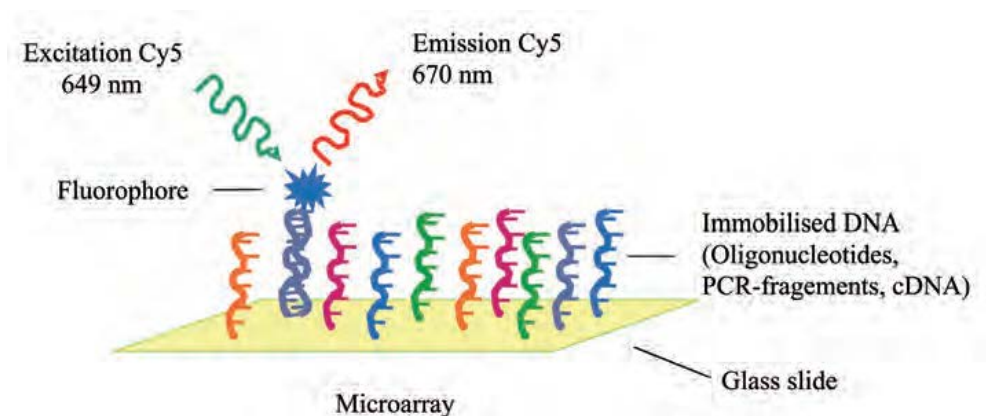
Uvođenje DNA-čip tehnologije 1995. godine bila je jedna od najmoćnijih inovacija u području mikrobiologije. To je novi eksperimentalni pristup u molekularnoj biologiji širokog spektra primjene, koji nudi mogućnost simultane analize velikog broja uzoraka pomoću niza različitih proba.

Mikročip, odnosno DNA-čip sastoji se od sljedova DNA koji se stavljaju na površinu staklene pločice točno određenim rasporedom. Proba na DNA-čipu predstavlja jedan lanac DNA i ako postoji komplementarna sekvenca u ispitivanom uzorku ona će se povezati s probom čipa.

Nukleinske kiseline s visokim stupnjem komplementarnosti hibridizirati će čvršće i lakše. Prije hibridizacije, ciljna nukleinska kiselina označena je fluorescentnom bojom, koja se može ugraditi izravno na nukleinsku kiseline, ili indirektno, obilježavanjem drugih tvari.

Primjena DNA mikročipova za identifikaciju morskih organizama još uvijek je relativno novo i inovativno polje istraživanja. Naime, ona pruža mogućnost za analizu velikog

broja vrsta u jednom eksperimentu, no još nije u širokoj primjeni u istraživanjima biljnog planktona (Gescher, Metfies i Medlin, 2010.) .



Slika 8. Shema detekcije mikročipom

(Preuzeto iz: Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis, 2010.)

4.4. PCR ZA DETEKCIJU I BROJANJE STANICA FITOPLANKTONA

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (QPCR) izuzetno je osjetljiva metoda koja se u posljednjih nekoliko godina primjenjuje pri detekciji i kvantifikaciji različitih vrsta fitoplanktona u uzorcima iz okoliša. Primjena navedene metode uvela je mnoge novitete u proučavanju populacijske dinamike mikroalgi u vodenim sustavima jer omogućuje istodobnu identifikaciju, kvantifikaciju i određivanje vijabilnosti ciljanih vrsta.

Lančana reakcija polimeraze (PCR) provodi se zagrijavanjem i hlađenjem reakcijske smjese koja sadrži DNA iz uzorka koji se ispituje, dvije različite probe (kratke sljedove umjetno sintetizirane DNA, komplementarne ciljnoj DNA), te enzim DNA polimerazu. Pri izvođenju PCR-a važno je paziti na temperaturu reakcijske smjese. Naime, potrebne su različite temperature za razdvajanje dva lanca DNA, za vezanje proba na komplementarnu DNA koja je prisutna u uzorku i za sintezu DNA enzimom DNA polimeraze. Ako se temperatura reakcijske smjese naglo ohladi, tada se probe mogu hibridizirati na područja DNA kojima su slične, ali ne i identične. Zbog toga se polimerazna lančana reakcija odvija se u uređaju koji automatski i precizno kontrolira promjene temperature tijekom ciklusa amplifikacije (PCR termoblok). Taj uređaj zagrijava i hladi reakcijsku smjesu u epruvetama, koje se nalaze u termobloku, a osim kontrole temperature, termoblok kontrolira i dužinu trajanja pojedinih dijelova ciklusa amplifikacije.

Kvalitativna analiza PCR reakcije provodi se na samom kraju reakcije, elektroforezom na agaroznom gelu i bojanjem bromidom.

Navedena metoda vizualizacije DNA uključuje postavljanje PCR produkta u jažicu na tankom agaroznom gelu i propuštanje struje kroz gel, od negativnog ka pozitivnom polu. DNA je negativno nabijena molekula, pa će stoga migrirati sa strujom kroz gel. Pošto su svi PCR proizvodi iste veličine, svi PCR produkti migriraju kroz gel istom brzinom tvoreći gusti pojas DNA. Kao rezultat dobivamo agarozni gel prožet bromidom koji fluorescira pod UV svjetlom. Kada se gel promatra pod UV svjetlom produkt PCR-a se može lako vidjeti kao fluorescentne linije, a intenzitet svjetline navedene linije odnosi se na količinu PCR proizvoda prisutnog na kraju reakcije (Galluzzi i Penna, 2010.) .



Slika 9. Agarozni gel s PCR produktima obojanim bromidom

(preuzeto s: https://en.wikibooks.org/wiki/Methods_and_Concepts_in_the_Life_Sciences/Agarose_Gel_Electrophoresis)

4. LITERATURA

Andersen P. (2010.) : Filtering – calcofluor staining – quantitative epifluorescence microscopy for phytoplankton analysis; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

Diercks S., Metfies K. and L. Medlin (2010.) : Electrochemical detection of toxic algae with a biosensor; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

Edler L. and M. Elbrächter (2010.) : The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

Gescher C., Metfies K. and L. Medlin (2010.) : Hybridisation and microarray fluorescent detection of phytoplankton; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

Galluzzi L. and A. Penna (2010.) : Quantitative PCR for detection and enumeration of phytoplankton; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

Karlson B., Godhe A., Cusack C. and E. Bresnan (2010.) : Introduction to methods for quantitative phytoplankton analysis; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

LeGresley M. and G. McDermott (2010.): Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis - haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

Poulton N. and J. Martin (2010.) : Imaging flow cytometry for quantitative phytoplankton analysis — FlowCAM; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

Töbe K., Kulis D., Anderson Donald M., Gladstone M. and Linda K., Medlin (2010.) : Detecting intact algal cells with whole cell hybridisation assays; Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO

Utermöhl, von H. (1931.) Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons. (Mit besondere Berücksichtigung des Ultraplanktons). Verh. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol., 5, 567-595

Internetski izvori :

https://en.wikibooks.org/wiki/Methods_and_Concepts_in_the_Life_Sciences/Agarose_Gel_Electrophoresis)

<http://www.medicinski-leksikon.info/znacenje/fluorokrom.html>

<http://www.microbehunter.com/the-hemocytometer-counting-chamber/>

<http://microscopy.duke.edu/learn/introtomicroscopy/configurations.html>

https://www.tedpella.com/calibration_html/Light-Microscopy-Calibration-Standards.html

http://www.thomassci.com/Equipment/Counters/_/THOMAS-NANOPLANKTON-COUNTING-SLIDE;

5. SAŽETAK

Fitoplanktonski organizmi su fotosintetski autotrofni organizmi koji su prva karika hranidbenog lanca svih vodenih ekosustava. Nadalje, fitoplankton je modifikacijama u broju i raznolikosti svojih zajednica dobar pokazatelj hidro-klimatskih promjena nastalih kao rezultat globalnog zagrijavanja, kao i ostalih okolišnih utjecaja. U određenim uvjetima okoliša može doći do povišenja stope rasta fitoplanktona i postizanja visoke gustoće stanica, te se ta pojava naziva se cvjetanje mora. Cvjetanje mora može biti prirodan događaj, no postoje vrste koje uzrokuju toksične, štetne cvatove.

Upravo zbog toga, važno je raditi na programima monitoringa fitoplanktona koji uključuju identifikaciju i kvantifikaciju vrsta. U ovom radu predstavljene su najpoznatije i najčešće korištene metode za analizu fitoplanktona temeljene na mikroskopskim promatranjima morfoloških obilježja stanica, kao i molekularne metode temeljene na genetičkoj raznolikosti fitoplanktonskih organizama.

6. SUMMARY

Phytoplankton organisms are photosynthetic autotrophic organisms which are the first link of the food chain of aquatic ecosystems. Furthermore, they have the potential to serve as indicators of hydro-climatic change resulting from global warming as well as other environmental impacts. Under certain environmental conditions phytoplankton can experience elevated growth rates and attain high cell densities. This is known as an algal bloom. Some algal blooms are natural events, but there are species which cause toxic, harmful blooms.

For this reason, it is important to work on programs for monitoring of phytoplankton, which include the identification and quantification of species. In this paper, the most popular and commonly used method for the analysis of phytoplankton based on microscopic observation of morphological characteristics of cells, as well as molecular methods based on the genetic diversity of phytoplankton organisms, has been presented.